

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:

ASAKO et al.

Application No.: 10/004,115

Filed: December 6, 2001

For: PROCESS FOR PRODUCING OPTICALLY ACTIVE ...

March 21, 2002

CLAIM OF PRIORITY

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Dear Sir:

Submitted herewith in the above-identified application, through the undersigned attorney, Applicants hereby request that their above-identified application be treated as entitled to the right accorded by Title 35, U.S. Code, Section 119, having regard to the application, whereby certified copies JP-2000-372704, filed 7 December 2000, JP 2000-006144, filed 15 January 2001, JP-2001-026594, filed 2 February 2001 and JP-2001-175175, filed 11 June 2001 of the priority document are enclosed.

Respectfully submitted,

FITCH, EVEN, TABIN & FLANNERY

By: 

Kendrew H. Colton
Registration No. 30.368

Fitch, Even, Tabin & Flannery
1801 K Street, N.W.
Suite 401L
Washington, D.C. 20006-1201
Telephone No. (202) 419-7000
Facsimile No. (202) 419-7007

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年12月 7日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-372704

出 願 人

Applicant(s):

住友化学工業株式会社

2001年10月19日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造

出証番号 出証特2001-3091229

【書類名】 特許願

【整理番号】 P152247

【提出日】 平成12年12月 7日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12P 7/12

【発明者】

 【住所又は居所】 富山県富山市文京町 1 - 2 - 1 8

 【氏名】 伊藤 伸哉

【発明者】

 【住所又は居所】 兵庫県宝塚市高司 4 丁目 2 番 1 号 住友化学工業株式会
社内

 【氏名】 脇田 龍平

【特許出願人】

 【識別番号】 000002093

 【氏名又は名称】 住友化学工業株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100093285

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 久保山 隆

 【電話番号】 06-6220-3405

【選任した代理人】

 【識別番号】 100094477

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 神野 直美

 【電話番号】 06-6220-3405

【選任した代理人】

 【識別番号】 100113000

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 中山 亨

【電話番号】 06-6220-3405

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 010238

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9903380

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

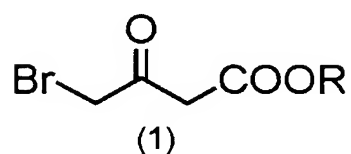
【発明の名称】 光学活性 4-ブロモ-3-ヒドロキシブタン酸エステルの製造法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

一般式 (1)

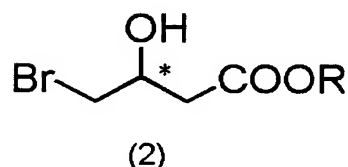
【化 1】



(式中、R は C 2 - C 8 アルキル基を表す。)

で示される 4-ブロモアセト酢酸エステル化合物に下記 a) または b) を作用させることを特徴とする一般式 (2)

【化 2】



(式中、R は前記と同じ意味を表し、* は不斉炭素原子を表す。)

で示される光学活性 4-ブロモ-3-ヒドロキシブタン酸エステル化合物の製造法。

a) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を有する酵素。

b) 配列番号 1 において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、一般式 (1) で示される 4-ブロモアセト酢酸エステル化合物を一般式 (2) で示される光学活性 4-ブロモ-3-ヒドロキシブタン酸エステル化合物に還元する酵素活性を有する酵素。

【請求項 2】

請求項 1 において * で示される不斉炭素原子に基づく光学異性体の一方の含有率が 80% 以上であることを特徴とする一般式 (2) で示される光学活性 4-ブロモ-3-ヒドロキシブタン酸エステル化合物の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は光学活性4-ブロモ-3-ヒドロキシブタン酸エステル化合物の製造法に関する。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】

後記一般式(2)で示される光学活性な4-ブロモ-3-ヒドロキシブタン酸エステル化合物は、医薬中間体として有用であり、その工業的に有利な製造法の開発が望まれている。

【0003】

【課題を解決するための手段】

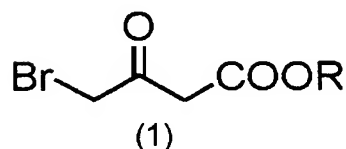
本発明者等は光学活性な4-ブロモ-3-ヒドロキシブタン酸エステル化合物の製造法を鋭意検討した結果、一般式(1)で示される4-ブロモアセト酢酸エステル化合物に配列番号1で示されるアミノ酸配列を有する酵素又は配列番号1において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、一般式(1)で示される4-ブロモアセト酢酸エステル化合物を一般式(2)で示される4-ブロモ-3-ヒドロキシブタン酸エステル化合物に還元する酵素活性を有する酵素を作用させることにより、一般式(2)で示される光学活性な4-ブロモ-3-ヒドロキシブタン酸エステル化合物が得られることを見出し、本発明を完成した。

【0004】

即ち、本発明は以下の発明を提供する。

一般式(1)

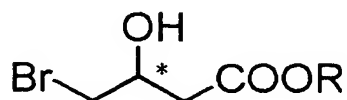
【化3】



(式中、RはC₂-C₈アルキル基を表す。)

で示される 4-ブromoアセト酢酸エステル化合物に下記 a) または b) を作用させることを特徴とする一般式 (2)

【化 4】



(式中、R は前記と同じ意味を表し、* は不斉炭素原子を表す。)

で示される光学活性 4-ブromo-3-ヒドロキシブタン酸エステル化合物の製造法 (以下、本発明製造法と記す。)

a) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を有する酵素。

b) 配列番号 1 において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、一般式 (1) で示される 4-ブromoアセト酢酸エステル化合物を一般式 (2) で示される光学活性 4-ブromo-3-ヒドロキシブタン酸エステル化合物に還元する酵素活性を有する酵素。

(以下、a) および b) をあわせて本酵素と総称する。)

【0 0 0 5】

【発明の実施の形態】

本発明製造法に用いられる一般式 (1) で示される 4-ブromoアセト酢酸エステル化合物において R で示される C2-C8 アルキル基としては、例えばエチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、オクチル基が挙げられる。

【0 0 0 6】

本発明製造法に用いられる配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を有する酵素をコードする遺伝子配列は配列番号 2 で示される (Appl. Microbiol. Biotechnol (1999) 52, 386-392)。該酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子は、天然に存在する遺伝子であっても、天然に存在する遺伝子を変異処理 (部分変異導入法、突然変異処理等) を行ったものであってもよい。

【0 0 0 7】

本酵素は、例えば配列番号 2 で示される遺伝子を含み、該遺伝子が発現する

ことによって配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を有する酵素を産生する微生物を培養することにより製造することができる。配列番号 2 で示される遺伝子を含有し、該遺伝子が発現することによって配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を有する酵素を産生する微生物は、天然に存在する微生物でも、配列番号 2 で示される塩基配列を有する遺伝子を導入した形質転換微生物であっても良い。

【 0 0 0 8 】

ここで、配列番号 2 で示される塩基配列を有する遺伝子を導入した形質転換微生物の作成法について説明する。

配列番号 2 で示される塩基配列を有する遺伝子を導入する宿主細胞としては、例えば、Escherichia、Bacillus、Corynebacterium、Staphylococcus、Streptomyces、Saccharomyces、Kluyveromyces 及び Aspergillus 属に属する微生物があげられる。

該遺伝子を宿主細胞へ導入する方法は、宿主となる細胞に応じて通常用いられる方法であれば特に限定されるものではなく、例えば、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」(1989)、Cold Spring Harbor Laboratory Press、「Current Protocols in Molecular Biology」(1987)、John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-50338-X 等に記載される塩化カルシウム法や、「Methods in Electroporation: Gene Pulser / E. coli Pulser System」Bio-Rad Laboratories, (1993) 等に記載されるエレクトロポレーション法が挙げられる。

【 0 0 0 9 】

該遺伝子が導入された形質転換微生物は、前述のようなベクターに含まれる選択マーカー遺伝子の表現型等を指標にして選抜することができる。形質転換微生物が該遺伝子を保有していることは、該形質転換微生物からベクター DNA を調製した後、調製された DNA について、例えば「モレキュラー・クローニング」(J. Sambrook ら、コールド・スプリング・ハーバー、1989 年) 等に記載される通常の方法(制限酵素部位の確認、塩基配列の解析、サザンハイブリダイゼーション等)を行うことにより確認することができる。

【 0 0 1 0 】

次に、本発明製造法に用いられる本酵素を製造するために配列番号 2 で示され

る遺伝子を含むし、該遺伝子が発現することによって配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を有する酵素を産生する微生物を培養する方法について説明する。

【0 0 1 1】

該微生物を培養する為の培地としては、微生物の培養に通常使用される炭素源や窒素源、有機塩や無機塩等を適宜含む各種の培地を用いることができる。

【0 0 1 2】

炭素源としては、例えばグルコース、デキストリン、シュークロース等の糖類、グリセロール等の糖アルコール、フマル酸、クエン酸、ピルビン酸等の有機酸、動植物油、糖蜜が挙げられる。これら炭素源の培地への添加量は、培地全量に対し通常、0.1～20% (w/v) 程度とするとよい。

【0 0 1 3】

窒素源としては、肉エキス、ペプトン、酵母エキス、麦芽エキス、大豆粉、コーン・スティープ・リカー (Corn Steep Liquor)、綿実粉、乾燥酵母、カザミノ酸等の天然有機窒素源やアミノ酸類、硝酸ナトリウム、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸のアンモニウム塩や硝酸塩、フマル酸アンモニウム、クエン酸アンモニウム等の有機酸のアンモニウム塩、尿素などの有機または無機窒素源等が挙げられる。これらのうち有機酸のアンモニウム塩、天然有機窒素源、アミノ酸類等は、多くの場合、炭素源としても使用することができる。窒素源の添加量は培地全量に対し通常、0.1～30% (w/v) 程度とするとよい。

【0 0 1 4】

有機塩や無機塩としては、カリウム、ナトリウム、マグネシウム、鉄、マンガン、コバルト、亜鉛等の塩化物、硫酸塩、酢酸塩、炭酸塩類およびリン酸塩類を挙げることができ、具体的には、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫酸マグネシウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、塩化コバルト、硫酸亜鉛、硫酸銅、酢酸ナトリウム、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、リン酸水素一カリウム、リン酸水素二カリウム等を挙げることができる。有機塩や無機塩の添加量は培地全量に対し通常、0.0001～5% (w/v) 程度とするとよい。

【0 0 1 5】

さらに、tacプロモーター、trcプロモーター、lacプロモーター等のアロラク
トースで誘導されるタイプのプロモーターと本酵素をコードする遺伝子とが機能
可能な形で接続されてなる遺伝子が導入された宿主細胞の場合には、該酵素の生
産を誘導するための誘導剤として、例えばisopropyl thio- β -D-galactoside (I
PTG) を培地中に少量加えてもよい。

【0016】

培養は、微生物の培養に通常使用される方法に準じて行うことができ、例えば
試験管振盪式培養、往復式振盪培養、ジャーファーマンター(Jar Fermenter)培
養、タンク培養等の液体培養、固体培養等の方法が可能である。ジャーファーマ
ンターを用いる場合には、ジャーファーマンター内に無菌空気を導入する必要が
あり、通常、培養液容量の約0.1～約2倍/分の通気条件を用いる。培養温度
は、微生物が生育可能な範囲で適宜変更できるが、通常、約15℃～約40℃の
範囲の培養温度が好ましく、培地のpHとしては、約6～約8の範囲が好ましい
。培養時間は、培養条件によって異なるが、通常約1日間～約5日間が望ましい。

【0017】

本発明製造法には、例えばこのようにして得られた本酵素を含有する菌体、菌
体処理物、または本酵素の精製物を用いることができる。

【0018】

ここで菌体処理物としては、例えば、凍結乾燥菌体、有機溶媒処理菌体、乾燥
菌体、菌体摩砕物、菌体の自己消化物、菌体の超音波処理物、菌体抽出物、菌体
のアルカリ処理物を挙げることができ、さらにこれら通常用いられる方法で固定
化したものがあげられる。

【0019】

本酵素の精製物は例えば本酵素を有する微生物の培養物から本酵素を精製する
ことにより製造することができきる。

本酵素を有する微生物の培養物から本酵素を精製する方法としては、通常のタ
ンパク質の精製において使用される方法を適用することができ、例えば次のよう
な方法を挙げることができる。

まず、微生物の培養物から遠心分離等により菌体を集めた後、これを超音波処

理、ダイノミル処理、フレンチプレス処理等の物理的破碎方法、または界面活性剤もしくはリゾチーム等の菌体溶菌酵素を用いる化学的破碎方法等によって破碎する。得られた破碎液から遠心分離、メンブレンフィルターろ過等により不溶物を除去して無細胞抽出液を調製し、これを陽イオン交換クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲルクロマトグラフィー等の分離精製方法を適宜用いて分画することによって本還元酵素を精製することができる。クロマトグラフィーに使用する担体としては、例えば、カルボキシメチル (CM) 基、DEAE 基、フェニル基もしくはブチル基等を導入したセルロース、デキストランまたはアガロース等の樹脂担体が挙げられる。市販の担体充填済みカラムを用いることもでき、例えば、Q-Sepharose FF、Phenyl-Sepharose HP (商品名、いずれもアマシャム ファルマシア バイオテク社製)、TSK-gel G3000SW (商品名、東ソー社製) 等が挙げられる。

【 0 0 2 0 】

続いて、本発明製造法について説明する。

本発明製造法において一般式 (1) で示される 4-ブロモアセト酢酸エステル化合物を一般式 (2) で示される光学活性 4-ブロモ-3-ヒドロキシブタン酸エステル化合物に変換する反応は一般式 (1) で示される 4-ブロモアセト酢酸エステル化合物に本酵素を作用させることによって達成される。

該反応は通常、水の存在下で行われ、水は緩衝液の形態であってもよく、この場合に用いられる緩衝剤としては、例えばリン酸ナトリウム、リン酸カリウム等のリン酸アルカリ金属塩、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム等の酢酸のアルカリ金属塩が挙げられる。

この場合の pH は反応が進行する範囲内で適宜変化させることができるが、通常は pH 4 ~ 10 の範囲で行われる。

【 0 0 2 1 】

緩衝液を溶媒として用いる場合、その量は一般式 (1) で示される 4-ブロモアセト酢酸エステル化合物 1 重量部に対して、通常 100 重量部以下である。

【 0 0 2 2 】

該反応の反応温度は、本酵素の安定性、反応速度の点から 0 ~ 70℃ であり、

好ましくは 10～40℃である。

【0023】

該反応は、水の他に有機溶媒の共存下に行うこともできる。この場合の有機溶媒としては、例えば、テトラヒドロフラン、*t*-ブチルメチルエーテル、イソプロピルエーテルなどのエーテル類、トルエン、ヘキサン、シクロヘキサン、ヘプタン、イソオクタン、デカンなどの炭化水素類、*t*-ブタノール、メタノール、エタノール、イソプロパノール、*n*-ブタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキサイドなどのスルホキサイド類、アセトンなどのケトン類、アセトニトリルなどのニトリル類およびこれらの混合物が挙げられる。

反応に使用する有機溶媒の量は、一般式(1)で示される4-ブロモアセト酢酸エステル化合物1重量部に対して通常は100重量部以下であり、好ましくは50重量部以下である。

【0024】

該反応はさらに、補酵素(例えばNADH、NADPH)を加えて行うこともできる。反応に用いられる補酵素の量は一般式(1)で示される4-ブロモアセト酢酸エステル化合物に対して通常0.5重量倍以下、好ましくは0.1重量倍以下である。

反応に補酵素を加える場合、補酵素の効率を高めるために、さらに以下のものを加えることが好ましい。

1) ギ酸、グルコース、イソプロパノール、2-ブタノール、2-ペンタノール、2-ヘキサノール、2-ヘプタノール、2-オクタノール等の化合物

この場合に使用されるこれらの化合物の量は一般式(1)で示される4-ブロモアセト酢酸エステル化合物に対して100重量倍以下、好ましくは10重量倍以下である。

2) ギ酸脱水素酵素、グルコース脱水素酵素等の脱水素酵素

この場合に使用される脱水素酵素の量は、一般式(1)で示される4-ブロモアセト酢酸エステル化合物に対して0.1重量倍以下、好ましくは0.05重量倍以下である。

【0025】

該反応は、例えば、水、一般式（１）で示される４－ブロモアセト酢酸エステル化合物、本酵素、必要に応じて補酵素、有機溶媒等を混合し、攪拌、振盪することにより行うことができる。

【 0 0 2 6 】

反応の終点は例えば反応液中の原料化合物の存在量を液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー等により追跡することにより決定することができる。反応時間の範囲は、通常５分間～４日間の範囲である。

【 0 0 2 7 】

反応終了後は、例えば、反応液をヘキサン、ヘプタン、*tert*-ブチルメチルエーテル、酢酸エチル、トルエン等の有機溶媒で抽出し、有機層を乾燥した後、濃縮することにより目的物を得ることができる。目的物は、必要によりカラムクロマトグラフィー等により精製することができる。

【 0 0 2 8 】

本発明製造法には、a) 配列番号１で示されるアミノ酸配列を有する酵素の代りに、b) 配列番号１において１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、一般式（１）で示される４－ブロモアセト酢酸エステル化合物を一般式（２）で示される光学活性４－ブロモ－３－ヒドロキシブタン酸エステル化合物に還元する酵素活性を有する酵素を用いることもできる。

この場合は、例えば、配列番号２で示されるDNAに例えば、DNAに点変異等を生じさせるための周知技術である、部位特定変異誘導法；DNAを選択的に開裂し、次いで選択されたヌクレオチドを除去又は付加し、DNAを連結する方法；オリゴヌクレオチド変異誘導法を施すことにより作成できる、配列番号１において１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、一般式（１）で示される４－ブロモアセト酢酸エステル化合物を一般式（２）で示される光学活性４－ブロモ－３－ヒドロキシブタン酸エステル化合物に還元する酵素活性を有する酵素をコードする遺伝子を作成し、前記と同様に形質転換体の作成、培養、反応等を行い本発明製造法を行うことができる。

【 0 0 2 9 】

【実施例】

以下、製造例等により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

【 0 0 3 0 】

フラスコに液体培地（水 1 0 0 0 m l にトリプトン 1 0 g、酵母エキス 5 g 及び塩化ナトリウム 5 g を溶解し、1 N 水酸化ナトリウム水溶液を滴下することにより、p H 7. 0 としたもの。）9 0 0 m l を入れて滅菌した後、アンピシリンを 1 0 0 μ g / m l、isopropyl thio- β -D-galactoside (IPTG) を 0. 4 m M になるように加え、ここに配列番号 2 で示される DNA を含有するプラスミド p U A R（受託番号：F E R M P - 1 8 1 2 7）で E. coli JM109 株を常法により形質転換した形質転換体 E. coli JM109/pUAR 株を前記組成の液体培地で培養した培養液 1 m l を接種し、3 7 $^{\circ}$ C で 1 4 時間振盪培養した。この培養液を遠心分離（1 5 0 0 0 \times g、1 5 分、4 $^{\circ}$ C）して得られた菌体を 5 0 m M リン酸 1 カリウム - リン酸 2 カリウムバッファー（p H 7. 0）3 0 m l に懸濁し、この懸濁液を遠心分離（1 5 0 0 0 \times g、1 5 分、4 $^{\circ}$ C）して洗浄菌体を得た。

5 % の 2 - プロパノールを含む 5 0 m M リン酸 1 カリウム - リン酸 2 カリウムバッファー（p H 7. 0）5 0 m l に N A D $^{+}$ 0. 1 m m o l および前記洗浄菌体 6 g を加えた。ここに、7 0 m g（0. 3 1 m m o l）の 4 - ブロモアセト酢酸イソプロピルを含むデカン 5 0 m l を注加し、室温で一昼夜攪拌した。その後反応液にセライトを入れ、しばらく攪拌し濾過して得られた溶液を分液した。水層をさらに酢酸エチルで 3 回抽出し、得られた有機層を全て合わせて濃縮することにより、4 - ブロモ - 3 - ヒドロキシブタン酸イソプロピル 5 0 m g を得た。

1 H-NMR (C D C l $_3$) δ (p p m) : 1. 2 6 (6 H)、2. 6 0 (2 H)、3. 2 1 (1 H)、3. 5 0 (2 H)、4. 1 9 ~ 4. 2 8 (1 H)、5. 0 2 ~ 5. 1 1 (1 H)

化学純度：9 9 % (G C)

光学純度：7 7 % e. e. (H P L C、ダイセル社キラルセル O D カラム、移

動層：ヘキサン／イソプロパノール＝98／2にトリフルオロ酢酸0.1%を加えたもの、0.5ml／分、UV220nm)

保持時間21分

【0031】

次に、4-ブロモ-3-ヒドロキシブタン酸イソプロピル光学純度測定に用いる標品の製造について参考例に記す。

【0032】

参考例

アセト酢酸イソプロピル23gを塩化メチレンに溶解し、氷冷下で、臭素26gを滴下した。室温まで昇温して8時間攪拌した後、反応液を濃縮して4-ブロモ-3-ヒドロキシブタン酸イソプロピル35gを得た。

4-ブロモ-3-ヒドロキシブタン酸イソプロピル4gをエタノール50mlに溶解し、氷冷下で水素化ホウ素ナトリウム4.04gをエタノール10mlに懸濁したものを徐々に滴下した。滴下終了後、反応液に酢酸を加えた後、水-酢酸エチルで分液した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、濃縮して得られる残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒：ヘキサン／エーテル）に付して4-ブロモ-3-ヒドロキシブタン酸イソプロピル1.3gを得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm) : 1.26 (6H)、2.60 (2H)、3.21 (1H)、3.50 (2H)、4.19～4.28 (1H)、5.02～5.11 (1H)

【0033】

得られた4-ブロモ-3-ヒドロキシブタン酸イソプロピルをダイセル社製キラルセルODカラム（移動層：ヘキサン／2-プロパノール＝98／2に0.1%トリフルオロ酢酸を加えたもの、流速0.5ml／分、UV検出器220nm）を用いてHPLC分析したところ、保持時間19分と21分に2本の面積比がほぼ等しいピークを与えた。

【0034】

【発明の効果】

本発明により、医薬中間体として有用な光学活性 4 - ブロモ - 3 - ヒドロキシ
ブタン酸エステルを製造することができる。

【 0 0 3 5 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Sumitomo Chemical Co., Ltd.

<120> Preparation of optically active 4-bromo-3-hydroxybutanoic acid ester compound

<130> P152247

<160> 2

<210> 1

<211> 385

<212> PRT

<213> *Corynebacterium* sp.

<400> 1

Met Lys Ala Ile Gln Tyr Thr Arg Ile Gly Ala Glu Pro Glu Leu Thr

1

5

10

15

Glu Ile Pro Lys Pro Glu Pro Gly Pro Gly Glu Val Leu Leu Glu Val

20

25

30

Thr Ala Ala Gly Val Cys His Ser Asp Asp Phe Ile Met Ser Leu Pro

35

40

45

Glu Glu Gln Tyr Thr Tyr Gly Leu Pro Leu Thr Leu Gly His Glu Gly

50

55

60

Ala Gly Lys Val Ala Ala Val Gly Glu Gly Val Glu Gly Leu Asp Ile
65 70 75 80

Gly Thr Asn Val Val Val Tyr Gly Pro Trp Gly Cys Gly Asn Cys Trp
85 90 95

His Cys Ser Gln Gly Leu Glu Asn Tyr Cys Ser Arg Ala Gln Glu Leu
100 105 110

Gly Ile Asn Pro Pro Gly Leu Gly Ala Pro Gly Ala Leu Ala Glu Phe
115 120 125

Met Ile Val Asp Ser Pro Arg His Leu Val Pro Ile Gly Asp Leu Asp
130 135 140

Pro Val Lys Thr Val Pro Leu Thr Asp Ala Gly Leu Thr Pro Tyr His
145 150 155 160

Ala Ile Lys Arg Ser Leu Pro Lys Leu Arg Gly Gly Ser Tyr Ala Val
165 170 175

Val Ile Gly Thr Gly Gly Leu Gly His Val Ala Ile Gln Leu Leu Arg
180 185 190

His Leu Ser Ala Ala Thr Val Ile Ala Leu Asp Val Ser Ala Asp Lys
195 200 205

Leu Glu Leu Ala Thr Lys Val Gly Ala His Glu Val Val Leu Ser Asp

210

215

220

Lys Asp Ala Ala Glu Asn Val Arg Lys Ile Thr Gly Ser Gln Gly Ala

225

230

235

240

Ala Leu Val Leu Asp Phe Val Gly Tyr Gln Pro Thr Ile Asp Thr Ala

245

250

255

Met Ala Val Ala Gly Val Gly Ser Asp Val Thr Ile Val Gly Ile Gly

260

265

270

Asp Gly Gln Ala His Ala Lys Val Gly Phe Phe Gln Ser Pro Tyr Glu

275

280

285

Ala Ser Val Thr Val Pro Tyr Trp Gly Ala Arg Asn Glu Leu Ile Glu

290

295

300

Leu Ile Asp Leu Ala His Ala Gly Ile Phe Asp Ile Gly Gly Gly Asp

305

310

315

320

Leu Gln Ser Arg Gln Arg Cys Arg Ser Val Ser Thr Thr Gly Cys Arg

325

330

335

Asn Ala Gln Arg Pro Cys Gly Cys Gly Pro Trp Ser Val Val Pro Thr

340

345

350

Ala Val Glu Arg Gln Arg Lys Asn Thr Asp Ala Arg Pro Asn Ser Ile

355

360

365

Arg Pro Gly Ile Ser Val Arg Asn Ser Val Cys Ala Ser Cys Thr Pro

370

375

380

Arg

385

<210> 2

<211> 1158

<212> DNA

<213> *Corynebacterium* sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1158)

<400> 2

atg aag gcg atc cag tac acg cga atc ggc gcg gaa ccc gaa ctc acg 48

Met Lys Ala Ile Gln Tyr Thr Arg Ile Gly Ala Glu Pro Glu Leu Thr

1

5

10

15

gag att ccc aaa ccc gag ccc ggt cca ggt gaa gtg ctc ctg gaa gtc 96

Glu Ile Pro Lys Pro Glu Pro Gly Pro Gly Glu Val Leu Leu Glu Val

20

25

30

acc gct gct ggc gtc tgc cac tcg gac gac ttc atc atg agc ctg ccc 144

Thr Ala Ala Gly Val Cys His Ser Asp Asp Phe Ile Met Ser Leu Pro

35

40

45

gaa gag cag tac acc tac ggc ctt ccg ctc acg ctc ggc cac gaa ggc 192

Glu Glu Gln Tyr Thr Tyr Gly Leu Pro Leu Thr Leu Gly His Glu Gly

50

55

60

gca ggc aag gtc gcc gcc gtc ggc gag ggt gtc gaa ggt ctc gac atc 240

Ala Gly Lys Val Ala Ala Val Gly Glu Gly Val Glu Gly Leu Asp Ile

65

70

75

80

gga acc aat gtc gtc gtc tac ggg cct tgg ggt tgc ggc aac tgt tgg 288

Gly Thr Asn Val Val Val Tyr Gly Pro Trp Gly Cys Gly Asn Cys Trp

85

90

95

cac tgc tca caa gga ctc gag aac tat tgc tct cgc gcc caa gaa ctc 336

His Cys Ser Gln Gly Leu Glu Asn Tyr Cys Ser Arg Ala Gln Glu Leu

100

105

110

gga atc aat cct ccc ggt ctc ggt gca ccc ggc gcg ttg gcc gag ttc 384

Gly Ile Asn Pro Pro Gly Leu Gly Ala Pro Gly Ala Leu Ala Glu Phe

115

120

125

atg atc gtc gat tct cct cgc cac ctt gtc ccg atc ggt gac ctc gac 432

Met Ile Val Asp Ser Pro Arg His Leu Val Pro Ile Gly Asp Leu Asp

130

135

140

ccg gtc aag acg gtg ccg ctg acc gac gcc ggt ctg acg ccg tat cac 480

Pro Val Lys Thr Val Pro Leu Thr Asp Ala Gly Leu Thr Pro Tyr His

145

150

155

160

gcg atc aag cgt tct ctg ccg aaa ctt cgc gga ggc tcg tac gcg gtt 528

Ala Ile Lys Arg Ser Leu Pro Lys Leu Arg Gly Gly Ser Tyr Ala Val

165

170

175

gtc att ggt acc ggc ggt ctc ggc cac gtc gct att cag ctc ctc cgc 576

Val Ile Gly Thr Gly Gly Leu Gly His Val Ala Ile Gln Leu Leu Arg

180

185

190

cac ctc tcg gcg gca acg gtc atc gct ttg gac gtg agc gcg gac aag 624

His Leu Ser Ala Ala Thr Val Ile Ala Leu Asp Val Ser Ala Asp Lys

195

200

205

ctc gaa ctg gca acc aag gta ggc gct cac gaa gtg gtt ctg tcc gac 672

Leu Glu Leu Ala Thr Lys Val Gly Ala His Glu Val Val Leu Ser Asp

210

215

220

aag gac gcg gcc gag aac gtc cgc aag atc act gga agt caa ggc gcc 720

Lys Asp Ala Ala Glu Asn Val Arg Lys Ile Thr Gly Ser Gln Gly Ala

225

230

235

240

gca ttg gtt ctc gac ttc gtc ggc tac cag ccc acc atc gac acc gcg 768

Ala Leu Val Leu Asp Phe Val Gly Tyr Gln Pro Thr Ile Asp Thr Ala

245

250

255

atg gct gtc gcc ggc gtc gga tca gac gtc acg atc gtc ggg atc ggg 816

Met Ala Val Ala Gly Val Gly Ser Asp Val Thr Ile Val Gly Ile Gly

260

265

270

gac ggc cag gcc cac gcc aaa gtc ggg ttc ttc caa agt cct tac gag 864

Asp Gly Gln Ala His Ala Lys Val Gly Phe Phe Gln Ser Pro Tyr Glu

275

280

285

gct tcg gtg aca gtt ccg tat tgg ggt gcc cgc aac gag ttg atc gaa 912

Ala Ser Val Thr Val Pro Tyr Trp Gly Ala Arg Asn Glu Leu Ile Glu

290

295

300

ttg atc gac ctc gcc cac gcc ggc atc ttc gac atc ggc ggt gga gac 960

Leu Ile Asp Leu Ala His Ala Gly Ile Phe Asp Ile Gly Gly Gly Asp

305

310

315

320

ctt cag tct cga caa cgg tgc cga agc gta tcg acg act ggc tgc cgg 1008

Leu Gln Ser Arg Gln Arg Cys Arg Ser Val Ser Thr Thr Gly Cys Arg

325

330

335

aac gct cag cgg ccg tgc ggt tgt ggt ccc tgg tct gta gta ccg aca 1056

Asn Ala Gln Arg Pro Cys Gly Cys Gly Pro Trp Ser Val Val Pro Thr

340

345

350

gcg gta gaa cga cag cgg aaa aac act gat gcc cgg ccg aat tcg att 1104

Ala Val Glu Arg Gln Arg Lys Asn Thr Asp Ala Arg Pro Asn Ser Ile

355

360

365

cgg ccg ggc atc agt gtc aga aat tcg gtg tgc gct agc tgc acg cct 1152

Arg Pro Gly Ile Ser Val Arg Asn Ser Val Cys Ala Ser Cys Thr Pro

370

375

380

cga tga

1158

Arg

385

【書類名】 要約書

【要約】

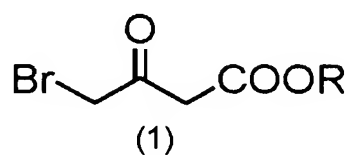
【課題】

光学活性な 4 - ブロモ - 3 - ヒドロキシブタン酸エステルの製造法を提供すること。

【解決手段】

一般式 (1)

【化 1】



(式中、R は C 2 - C 8 アルキル基を表す。)

で示される 4 - ブロモアセト酢酸エステル化合物にある種の酵素を作用させる。

【選択図】

なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002093]

1. 変更年月日 1990年 8月28日
[変更理由] 新規登録
住 所 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号
氏 名 住友化学工業株式会社